



19 BUNDESREPUBLIK  
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES  
PATENT- UND  
MARKENAMT

12 Offenlegungsschrift  
10 DE 199 44 148 A 1

51 Int. Cl. 7:  
G 02 B 21/00

21 Aktenzeichen: 199 44 148.0  
22 Anmeldetag: 15. 9. 1999  
43 Offenlegungstag: 29. 3. 2001

71 Anmelder:  
Leica Microsystems Heidelberg GmbH, 69120  
Heidelberg, DE  
74 Vertreter:  
Ullrich & Naumann, 69115 Heidelberg

72 Erfinder:  
Engelhardt, Johann, Dr., 76669 Bad Schönborn, DE;  
Ulrich, Heinrich, Dr., 69121 Heidelberg, DE; Hay,  
William C., 69493 Hirschberg, DE

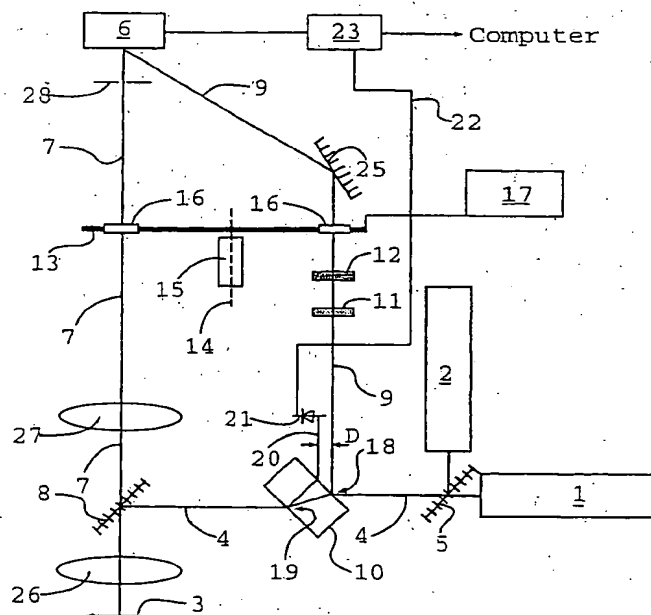
56 Entgegenhaltungen:  
DE 34 00 317 C2  
DE 196 21 802 A1  
DE 91 03 139 U1

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

Prüfungsantrag gem. § 44 PatG ist gestellt

54 Laserscanmikroskop

57 Ein Laserscanmikroskop, vorzugsweise konfokales Laserscanmikroskop, und ein Verfahren zur Referenzkorrektur für ein Laserscanmikroskop, insbesondere für ein konfokales Laserscanmikroskop, mit einem zwischen einer Laserlichtquelle (1, 2) und einem Objekt (3) verlaufenden Beleuchtungsstrahlengang (4) und einem zwischen dem Objekt (3) und einer Detektionseinrichtung (6) verlaufenden Detektionsstrahlengang (7), ist zur Fehlerkorrektur mit mindestens einem zur Referenzmessung dienenden Referenzstrahlengang (9) dadurch gekennzeichnet, dass aus dem Beleuchtungsstrahlengang (4) Referenzlicht in den Referenzstrahlengang (9) einkoppelbar ist und dass das Referenzlicht von einer Detektionseinrichtung (6) qualitativ und/oder quantitativ nachweisbar ist.



DE 199 44 148 A 1

DE 199 44 148 A 1

## Beschreibung

Die Erfindung betrifft ein Laserscanmikroskop, vorzugsweise ein konfokales Laserscanmikroskop, mit einem zwischen einer Laserlichtquelle und einem Objekt verlaufenden Beleuchtungsstrahlengang und einem zwischen dem Objekt und einer Detektionseinrichtung verlaufenden Detektionsstrahlengang.

Laserscanmikroskope der gattungsbildenden Art sind seit geraumer Zeit bekannt und werden u. a. in der Halbleiterindustrie zur Waferinspektion sowie in der biomedizinischen Grundlagenforschung eingesetzt. Lediglich beispielhaft wird dazu auf die DE 43 30 347 A verwiesen. Aus der DE 43 30 347 A ist ein gattungsbildendes Laserscanmikroskop bekannt, welches sich insbesondere für die biomedizinische Anwendung eignet, bei der das zu untersuchende Objekt spezifisch mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen markiert ist. Das Fluoreszenzlicht der Fluoreszenzfarbstoffe kann nach Anregung mit geeigneten Laserlichtquellen nachgewiesen werden.

Mit Laserscanmikroskopen der gattungsbildenden Art werden bislang lediglich Relativmessungen durchgeführt. Danach ist es nur für jeweils ein Objekt möglich, Fluoreszenzlicht der in dem Objekt vorliegenden Fluoreszenzfarbstoffverteilung zu erfassen, um beim Nachweis von unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen diese quantitativ mit einer hinreichenden Genauigkeit zueinander ins Verhältnis zu setzen. Wenn mit dem gleichen Laserscanmikroskop ein weiteres Objekt gemessen wird, wäre es wünschenswert, die gemessenen Bilddaten dieser beiden Objekte zueinander mit einer entsprechenden Genauigkeit ins Verhältnis zu setzen. Quantitative Vergleichsmessungen an unterschiedlichen Objekten wären vor allem für diagnostische Anwendungen im medizinischen Bereich erforderlich. Das ist bislang deshalb nicht möglich, weil bei den Laserscanmikroskopen der gattungsbildenden Art keine Vorrichtung zur Kalibrierung der im Mikroskop relevanten Baugruppen vorgesehen ist und darüber hinaus die einzelnen Baugruppen eines Laserscanmikroskops einer Kurz- und Langzeitschwankung aufgrund äußerer Einflüsse unterliegen, die Vergleichsmessungen verschiedener Objekte selbst bei entsprechender Kalibrierung der Mikroskopbaugruppen mit einer hinreichenden Genauigkeit unmöglich machen.

Eine hinreichende Kalibrierung der relevanten Baugruppen eines Laserscanmikroskops ist beispielsweise mit der aus der DE 199 06 763 A bekannten Vorrichtung möglich, wobei dort die Kurz- und Langzeitschwankung aufgrund der äußeren Einflüsse nicht kompensierbar sind. Hierzu zählen vor allem die Temperaturabhängigkeiten einzelner Baugruppen des Mikroskops, beispielsweise der verwendeten Filter oder des Detektors, wie auch Intensitätsschwankungen des Lasers (Modensprünge).

Der vorliegenden Erfindung liegt daher die Aufgabe zugrunde, ein Laserscanmikroskop, vorzugsweise ein konfokales Laserscanmikroskop, anzugeben, mit dem es möglich ist, Absolutmessungen an unterschiedlichen Objekten mit einer hinreichenden Genauigkeit durchzuführen und dabei störende Einflüsse auf die Meßbedingungen zu korrigieren. Des weiteren liegt der Erfindung die Aufgabe zugrunde, ein Verfahren zur Lösung dieser Aufgabe anzugeben.

Die voranstehende Aufgabe wird durch die Merkmale des Patentanspruches 1 gelöst. Danach ist ein gattungsbildendes Laserscanmikroskop, vorzugsweise ein konfokales Laserscanmikroskop, dadurch gekennzeichnet, dass mindestens ein zur Referenzmessung dienender Referenzstrahlengang vorgesehen ist, dass aus dem Beleuchtungsstrahlengang Referenzlicht in den Referenzstrahlengang einkoppelbar ist und dass das Referenzlicht von einer Detektionseinrichtung

qualitativ und/oder quantitativ nachweisbar ist.

Erfindungsgemäß ist zunächst erkannt worden, dass mit herkömmlichen Laserscanmikroskopen Vergleichsmessungen unterschiedlicher Objekte selbst bei Verwendung geeigneter Kalibriereinrichtungen mit einer absoluten Genauigkeit aufgrund von Kurz- bzw. Langzeitschwankungen einzelner Baugruppen des Laserscanmikroskops nicht möglich sind. Es ist erkannt worden, dass vor allem Intensitätsschwankungen des Lasers (z. B. Modensprünge) wie auch eine Temperaturänderung der Filter und des Detektors die vergleichenden Messungen unterschiedlicher Objekte negativ beeinflussen bzw. verfälschen. In erfindungsgemäßer Weise weist daher das Laserscanmikroskop einen Referenzstrahlengang auf, mit dem es möglich ist, entsprechende Referenzmessungen durchzuführen. Hierbei wird Referenzlicht aus dem Beleuchtungsstrahlengang in den Referenzstrahlengang eingekoppelt, das von einer Detektionseinrichtung nachgewiesen wird. Hierdurch können neben der eigentlichen Messung des Objekts Referenzmessungen durchgeführt werden, mit denen die Kurz- bzw. Langzeitschwankungen der Einzelkomponenten des Laserscanmikroskops kompensiert werden können.

Der Referenzstrahlengang verläuft zwischen der Auskopplungsstelle und der Detektionseinrichtung, wobei die Auskopplungsstelle im Beleuchtungsstrahlengang des Laserscanmikroskops vorgesehen ist. Das in den Referenzstrahlengang eingekoppelte Laserlicht der Laserlichtquelle wird im folgenden Referenzlicht genannt.

Im Hinblick auf eine konkrete Ausgestaltung befindet sich die Auskopplungsstelle zwischen der Laserlichtquelle und der Strahlteilereinrichtung. Somit wird sichergestellt, dass lediglich Licht der Laserlichtquelle in den Referenzstrahlengang eingekoppelt wird, also bspw. keine Objekt-Fluoreszenzlicht- oder konventionelle Mikroskop-Durchlichtanteile dem Referenzlicht überlagert sind.

Wenn als Strahlteilereinrichtung ein AOBS (Acousto-Optical-Beam-Splitter) verwendet wird, ist es von Vorteil, wenn sich die Auskopplungsstelle direkt bei dem AOBS befindet. Ein Laserscanmikroskop mit einem AOBS wird in der DE-Patentanmeldung 199 06 757.0 beschrieben.

In vorteilhafter Weise sind in dem Referenzstrahlengang weitere optische Komponenten angeordnet. Hierzu zählt eine Streuscheibe, die beispielsweise aus einer Glasplatte mit aufgerauhter Oberfläche oder aus einer Glasplatte aus Milchglas besteht. Des weiteren ist in dem Referenzstrahlengang mindestens ein Strahlumlenkelement angeordnet, so dass hierdurch eine Strahlführung des Referenzstrahlengangs realisierbar ist.

Im Hinblick auf eine konkrete Ausgestaltung ist in dem Referenzstrahlengang mindestens ein lichtempfindlicher Sensor angeordnet, mit dessen Hilfe Referenzlicht nachgewiesen werden kann. Dieser lichtempfindliche Sensor ist vorzugsweise lediglich für einen Teilstrahlengang des Referenzstrahlengangs vorgesehen.

In dem Referenzstrahlengang ist mindestens ein Strahlabschwächer (Graufilter oder Neutralglasfilter) angeordnet, mit dessen Hilfe die Referenzlichtintensität an die Eigenschaften der Detektionseinheit angepasst werden kann. In vorteilhafter Weise wird die Durchlässigkeit der Strahlabschwächer so gewählt, dass die Referenzlichtintensität die gleiche Größenordnung aufweist wie die vom Objekt nachzuweisende Lichtintensität, so dass zur Detektion des Referenz- und Detektionslichts nahezu der gleiche Dynamikbereich vorliegt.

Ein Filteraufnahmelement ist ebenfalls in dem Referenzstrahlengang angeordnet, das auf den Beleuchtungs- und/oder Detektionsstrahlengang wirkt. Hierbei kann es sich um ein konventionelles Filterrad oder um einen linear angeord-

neten Filterschieber handeln, in die ein oder mehrere unterschiedliche Filter eingesetzt werden können. Üblicherweise werden als Filtereinsätze beschichtete Glasplatten verwendet, die ein wellenlängenspezifisches Reflexions- bzw. Transmissionsverhalten aufweisen. Auch die Verwendung von farbigen Glasplatten bzw. von sogenannten Holographic-Notch-Filtern ist durchaus üblich. Das Filteraufnahmeelement ist beweglich angeordnet, so beispielsweise drehbar oder in linearer Richtung verschiebbar. Mit dem mit Filtereinsätzen bestückten Filteraufnahmeelement ist es möglich, den mit der Detektionseinrichtung nachzuweisenden Strahlengang zu selektieren. So wird in vorteilhafter Weise in einer Stellung des Filteraufnahmeelements nur Licht vom Detektionsstrahlengang zur Detektionseinrichtung selektiert, in einer anderen Stellung des Filteraufnahmeelements wird nur Licht vom Referenzstrahlengang für die Detektionseinrichtung selektiert und in einer weiteren Stellung des Filteraufnahmeelements wird zur Messung eines Dunkelstroms kein Licht für die Detektionseinrichtung selektiert.

Da die in dem Filteraufnahmeelement verwendeten Filter teilweise temperaturabhängig sind und eine Temperaturveränderung sich in einer veränderten Transmissionscharakteristik der Filter auswirkt, wird das Filteraufnahmeelement auf einer konstanten Temperatur gehalten. Hierzu wird das gesamte Filteraufnahmeelement mit Hilfe einer geeignet geregelten Heizung, insbesondere mit einem Heizwiderstand, beheizt.

In einer bevorzugten Ausführung sind die weiteren optischen Elemente in dem Referenzstrahlengang von der Auskopplungsstelle aus gesehen nach der Streuscheibe angeordnet. Das von der Laserlichtquelle in den Referenzstrahlengang eingekoppelte kohärente Laserlicht ist nach dem Durchgang durch die Streuscheibe nicht mehr kohärent, so dass die Wechselwirkung des durch die Streuscheibe hindurch getretenen Lichts mit den weiteren optischen Elementen im Referenzstrahlengang keine unerwünschten Interferenzerscheinungen hervorruft. Interferenzerscheinungen dieser Art wirken sich äußerst störend auf Messungen aus, da bereits geringste Temperatur- bzw. dadurch induzierte Weglängenänderungen im optischen Strahlengang mit einer Intensitätsmodulation des zu messenden Lichts verbunden sind.

In vorteilhafter Weise wird als Auskopplungselement ein dicker Strahlteiler verwendet, der als planparallele Glasplatte ausgestaltet sein kann. In einer bevorzugten Ausführung ist dieser Strahlteiler mindestens vier Millimeter dick, im Winkel von 45° zum Beleuchtungsstrahlengang angeordnet und es wird neben dem Referenzstrahl mindestens ein weiterer Lichtstrahl ausgekoppelt. Bei dem weiteren Lichtstrahl könnte es sich beispielsweise um den Sekundärreflex des von der Laserlichtquelle kommenden Laserlichts an der Strahlteilerplatte handeln. Mit dem Sekundärreflex ist die in der dicken Strahlteilerplatte auftretende, erste interne Reflexion an der - von der Laserlichtquelle aus gesehen - abgewandten Glasoberfläche gemeint, die nach Durchtritt durch die der Laserlichtquelle zugewandten Glasoberfläche der Strahlteilerplatte in Richtung des Referenzstrahlengangs austritt. In Abhängigkeit der Dicke der verwendeten Strahlteilerplatte ist somit ein lateraler Parallelversatz des zusätzlich ausgekoppelten Lichtstrahls zu dem Referenzstrahl gegeben.

Die Intensität des zusätzlich ausgekoppelten Lichtstrahls wird mit einem lichtempfindlichen Sensor nachgewiesen bzw. gemessen. Das so gemessene, der Ausgangsleistung der verwendeten Laserlichtquelle direkt proportionale Signal wird als Referenzsignal für die Detektionseinrichtung verwendet. In einer bevorzugten Ausführung wird das so gewonnene Referenzsignal als Referenzspannung für die Digitalisierungseinrichtung benutzt.

Somit kann in vorteilhafter Weise und mit einfachen Mitteln (lediglich einer entsprechenden Photodiode) die sich negativ auf die Objektmessung auswirkende Intensitätsschwankung der Laserlichtquelle korrigiert werden. Insbesondere können hierdurch Kurzzeit-Intensitätsschwankungen der Laserlichtquelle - beispielsweise Modensprünge - korrigiert werden, wenn in vorteilhafter Weise diese Korrektur während der Datenaufnahme des Objekts, also dem eigentlichen Meßvorgang, durchgeführt wird.

Im Hinblick auf die Korrektur von vor allem Langzeitschwankungen der in dem Mikroskop eingebauten Komponenten ist es vorteilhaft, die mit dem Laserscanmikroskop gemessenen Bilddaten mit Hilfe von den mit dem Referenzstrahlengang gemessenen Referenzsignalen geeignet zu korrigieren. Mit dieser Maßnahme wirkt man vor allem der Langzeitdrift der Detektionseinrichtung oder der Laserlichtquelle entgegen. Diese Drift ergibt einen Offset innerhalb der gemessenen Bilddaten, der ja gerade einen quantitativen Vergleich zeitlich auseinander liegender Messungen mit der geforderten absoluten Genauigkeit nicht möglich macht. Im Konkreten könnte die Korrektur der gemessenen Bilddaten bei der Digitalisierungseinrichtung mit Hilfe einer Eingangs-Lookup-Tabelle realisiert werden. Diese Eingangs-Lookup-Tabelle (LUT) kann derart implementiert sein, dass die Intensität der gemessenen Bilddaten bei dem Digitalisierungsschritt gemäß den gemessenen Referenzsignalen des Referenzstrahlengangs derart digitalisiert werden, dass ein weiterer Korrekturschritt der so digitalisierten Bilddaten nicht mehr erforderlich ist. Diese Vorgehensweise hat den Vorteil, dass dann die Korrektur "online", also bereits während der Bildaufnahme, erfolgen kann.

Im Hinblick auf eine weitere Ausführung könnte in dem Referenzstrahlengang mindestens eine weitere Lichtquelle vorgesehen sein, die beispielsweise zu Kalibrierungszwecken der im Referenzstrahlengang befindlichen optischen Komponenten eingesetzt werden kann. Des weiteren ist es denkbar, dass in dem Referenzstrahlengang mindestens ein weiterer Detektor angeordnet ist. So könnte beispielsweise mit einem zusätzlichen Detektor die Lichtintensität im Referenzstrahlengang vor einem optischen Element des Referenzstrahlengangs und mit einem weiteren Detektor die Intensität nach diesem optischen Element gemessen werden, um so mögliche Störeinflüsse dieses optischen Elements ausschließen bzw. kompensieren zu können.

Zur Kompensation der Temperaturabhängigkeit der optischen Elemente, die im Beleuchtungs- und/oder im Detektionsstrahlengang, nicht jedoch im Referenzstrahlengang angeordnet sind, könnten diese auf einer konstanten Temperatur gehalten werden. Dies könnte wie bei dem Filteraufnahmeelement ebenfalls mit einer geregelten Heizung realisiert werden.

In verfahrensmäßiger Hinsicht wird zur Lösung der eingangs genannten Aufgabe ein Verfahren mit den Merkmalen des Patentanspruchs 30 angegeben. Danach ist ein erfindungsgemäßes Verfahren dadurch gekennzeichnet, dass das aus dem Beleuchtungsstrahlengang zur Fehlerkompensation dienende Referenzlicht in den Referenzstrahlengang eingekoppelt und von einer Detektionseinrichtung qualitativ und/oder quantitativ nachgewiesen wird.

Somit können Kurz- und Langzeitschwankungen der Einzelkomponenten des Laserscanmikroskops auf vorteilhafte Weise kompensiert werden, vor allem ist es durch die mit der Objektmessung zeitgleich verlaufende Referenzmessung möglich, Kurzzeitschwankungen der Komponenten zu kompensieren.

Im Hinblick auf die Kompensation von Langzeitschwankungen der in dem Laserscanmikroskop befindlichen Bau-

gruppen ist in vorteilhafter Weise vorgesehen, unmittelbar vor und/oder nach jedem Meßzyklus Referenzsignale zu messen, mit denen die gemessenen Objektbilddaten korrigiert werden können. Hierbei könnten quantitative Werte wie die aktuelle Laserlichtleistung der verwendeten Lichtquelle oder der Dunkelstrom der Detektionseinrichtung von besonderem Interesse sein. Ein Meßzyklus könnte aus einer ein-, zwei- oder dreidimensionalen Datenaufnahme bestehen.

Zur Referenzkorrektur werden zumindest die im folgenden aufgeführten Meßgrößen gemessen, nämlich der Dunkelstrom  $I_0$ , die Referenz  $R$  sowie der Dunkelstrom  $R_0$  der Referenz.

Mit den gemessenen Referenzsignalen werden die gemessenen Bilddaten  $I_{XYZ}$  in geeigneter Weise korrigiert, vorzugsweise gemäß der Vorschrift

$$I_{XYZ,KORR} = F \cdot (I_{XYZ} - I_0) / (R - R_0)$$

Hierbei wird für die Bezeichnung  $F$  ein geeigneter Skalierungsfaktor eingesetzt, der letztendlich die gemessenen Bilddaten während der Korrektur auf einen geeigneten Digitalisierungsbereich abbildet, beispielsweise auf den 12-Bit-Bereich, der die Grauwerte von 0 bis 4095 umfaßt.

Zur Vereinfachung der Referenzkorrektur könnte  $I_0 = R_0$  gesetzt werden, wenn nämlich aufgrund der durchgeführten Messungen des konkret verwendeten Referenzkorrekturverfahrens der Dunkelstrom  $R_0$  der Referenz sich vom Wert her von dem Dunkelstrom  $I_0$  des Systems bei ausgeblendeter Lichtquelle kaum unterscheidet.

Es gibt nun verschiedene Möglichkeiten, die Lehre der vorliegenden Erfindung in vorteilhafter Weise auszugestalten und weiterzubilden. Dazu ist einerseits auf die den nebengeordneten Patentansprüchen 1 und 30 nachgeordneten Ansprüche, andererseits auf die nachfolgende Erläuterung zweier Ausführungsbeispiele der Erfindung anhand der Zeichnungen zu verweisen. In Verbindung mit der Erläuterung der bevorzugten Ausführungsbeispiele der Erfindung anhand der Zeichnungen werden auch im allgemeinen bevorzugte Ausgestaltungen und Weiterbildungen der Lehre erläutert. In den Zeichnungen zeigt

Fig. 1 in einer schematischen Darstellung ein Ausführungsbeispiel eines erfindungsgemäßen Laserscanmikroskops, wobei dort die Komponenten des Laserscanmikroskops lediglich vereinfacht dargestellt sind,

Fig. 2 in einer schematischen Darstellung das Laserscanmikroskop aus Fig. 1, bei dem eine alternative Beleuchtungsvorrichtung vorgesehen ist und

Fig. 3 in einer schematischen Darstellung ein Filteraufnahmeelement.

In der schematischen Darstellung der Fig. 1 ist ein konfokales Laserscanmikroskop gezeigt, das einen zwischen den beiden Laserlichtquellen 1, 2 und dem Objekt 3 verlaufenden Beleuchtungsstrahlengang 4 aufweist. Hierbei werden die beiden Strahlen der Laser 1 und 2 über den Strahlvereiniger 5 zusammengeführt. Zwischen dem Objekt 3 und der Detektionseinrichtung 6 verläuft der Detektionsstrahlengang 7, wobei zwischen dem Strahlteiler 8 und dem Objekt 3 der Beleuchtungsstrahlengang 4 mit dem Detektionsstrahlengang 7 identisch ist.

Erfindungsgemäß weist das konfokale Laserscanmikroskop einen Referenzstrahlengang 9 auf, in den Referenzlicht des Beleuchtungsstrahlengangs 4 eingekoppelt wird, wobei das Referenzlicht von der Detektionseinrichtung 6 qualitativ und quantitativ nachgewiesen wird. Hierbei wird an der Auskopplungsstelle 10 bzw. 18 Licht des Beleuchtungsstrahlengangs 4 in den Referenzstrahlengang 9 eingekoppelt, wobei hier die Auskopplungsstelle 10 zwischen dem Strahlvereiniger 5 und dem Strahlteiler 8 angeordnet ist.

Erfindungsgemäß sind in dem Referenzstrahlengang 9 weitere optische Komponenten angeordnet. Hierbei hat die Streuscheibe 11 die Aufgabe, das aus dem Beleuchtungsstrahlengang kommende kohärente Referenzlicht inkohärent zu machen und darüber hinaus dessen Intensität an die Intensität des vom Objekt 3 zu detektierende Detektionslicht anzupassen. Die Streuscheibe 11 hat weiterhin die Aufgabe, das Referenzlicht für die Detektionseinrichtung 6 positionsunempfindlich zu machen, d. h. den im Querschnitt punktförmigen Referenzlichtstrahl etwas aufzuweiten, so dass – verglichen zur Fluoreszenzlichtdetektion – nahezu die gleichen Nachweisbedingungen vorliegen. Im weiteren Verlauf ist ein Strahlabschwächer 12 in Form eines Neutralglasfilters angeordnet, der zusätzlich zur Anpassung der Lichtintensitäten im Detektionsstrahlengang 7 an die Lichtintensitäten im Referenzstrahlengang 9 verwendet wird und bezüglich des Transmissionsanteils geeignet dimensioniert ist.

Bei dem in Fig. 1 gezeigten Ausführungsbeispiel eines erfindungsgemäßen Mikroskops ist ein Filteraufnahmeelement 13 vorgesehen, das auf den Referenzstrahlengang 9 und den Detektionsstrahlengang 7 wirkt. Das Filteraufnahmeelement 13 ist um die Achse 14 drehbar angeordnet und wird von dem Motor 15 in die gewünschten Positionen gefahren.

Das Filteraufnahmeelement 13 weist, wie in Fig. 3 gezeigt, drei Aufnahmehalterungen für Filtereinsätze 16 auf. Hierbei wird in der einen Aufnahmehalterung der Sperrfilter für die Laserlichtquelle 1 eingesetzt, in der nächsten Aufnahmehalterung wird der Sperrfilter für den Laser 2 eingesetzt; die dritte Aufnahmehalterung verbleibt leer. Unter dem Begriff Sperrfilter ist in diesem Zusammenhang zu verstehen, dass Licht aller Wellenlängen, ausgenommen der Anregungswellenlänge der entsprechenden Laserlichtquelle, den Sperrfilter passieren kann.

Für das drehbar angeordnete Filteraufnahmeelement sind vier Arbeitspositionen vorgesehen. In der ersten wird die Aufnahmehalterung des Sperrfilters für den Laser 1 so positioniert, dass nur das Licht des Detektionsstrahlengangs 7 zur Detektionseinrichtung 6 freigegeben wird. In der zweiten Arbeitsposition wird das Filteraufnahmeelement 13 so positioniert, dass die Aufnahmehalterung mit dem Sperrfilter des Lasers 2 in dem Detektionsstrahlengang 7 positioniert wird, um ebenfalls nur Licht des Detektionsstrahlengangs 7 zur Detektionseinrichtung 6 freizugeben. In der dritten Arbeitsposition des Filteraufnahmeelements 13 wird die leer gebliebene Aufnahmehalterung in dem Referenzstrahlengang 9 positioniert, so dass nur Referenzlicht des Referenzstrahlengangs 9 zur Detektionseinrichtung 6 freigegeben wird. Eine vierte Betriebsposition des Filteraufnahmeelements 13 ist derart vorgesehen, dass weder Licht des Detektionsstrahlengangs 7 noch Licht des Referenzstrahlengangs 9 zur Detektionseinrichtung 6 gelangt.

Da in dieser konkret beschriebenen erfindungsgemäßen Ausführung nicht vorgesehen ist, die einzelnen in dem Filteraufnahmeelement 13 eingesetzten Filtereinsätze 16 quantitativ mit dem Referenzstrahlengang 9 zu vermessen, wird zur Vermeidung von äußeren Temperatureinflüssen auf die Filtereinsätze 16 das gesamte Filteraufnahmeelement 13 mit einer Temperatursteuerung 17 und einem nicht eingezeichneten Heizwiderstand auf konstanter Temperatur gehalten.

In erfindungsgemäßer Weise sind der im Referenzstrahlengang 9 angeordnete Strahlabschwächer 12 wie auch die in den Referenzstrahlengang 9 einschwenkbaren Filtereinsätze 16 – von der Auskopplungsstelle 10 aus gesehen – der Streuscheibe 11 nachgeordnet. Da das von der Auskopplungsstelle 10 in den Referenzstrahlengang 9 eingekoppelte Referenzlicht nach dem Durchgang durch die Streuscheibe 11 nicht mehr kohärent ist, werden störende Interferenzen-

scheinungen an den der Streuscheibe 11 nachgeordneten Elementen 12, 16 im Referenzstrahlengang 9 vermieden.

Für das im Beleuchtungsstrahlengang 4 angeordnete Auskopplungselement dient ein dicker Strahlteiler, der als dicke planparallele Glasplatte ausgeführt ist. Er ist in einem Winkel von 45° relativ zu dem Beleuchtungsstrahlengang 4 angeordnet und weist keine besonderen wellenlängenspezifischen Reflexions- und Transmissionseigenschaften auf. Die Dicke der Strahlteilerplatte beträgt 10 Millimeter. Die in den Referenzstrahlengang 9 eingekoppelte Referenzlichtintensität ist vor allem von dem Brechungsindex der Strahlteilerplatte abhängig (Fresnel'sche Formeln). Somit wird der Hauptreflex des Beleuchtungslichts an der den Lasern 1, 2 zugewandten Glasoberfläche der Strahlteilerplatte 18 als Referenzlicht für den Referenzstrahlengang 9 verwendet.

An der den Lichtquellen abgewandten Glasoberfläche der Strahlteilerplatte 10 tritt in der Strahlteilerplatte 10 ein Sekundärreflex 19 auf, der, nachdem er an der den Lasern 1, 2 zugewandten Glasoberfläche der Strahlteilerplatte 10 ausgetreten ist, in Richtung des Referenzstrahlengangs 9 seitlich versetzt zu diesem verläuft. In Abhängigkeit von der Dicke der Strahlteilerplatte 10 kann somit der laterale Strahlversatz D angepaßt werden. Darüber hinaus ist durch den lateralen Strahlversatz D keine räumliche Überlagerung des Referenzlichtstrahls 9 (Hauptreferenz) mit dem weiter ausgekoppelten Lichtstrahl 20 (Sekundärreflex) möglich. Hierdurch werden auch Interferenzerscheinungen dieser beiden, aus dem Beleuchtungsstrahlengang 4 ausgekoppelten Lichtstrahlen vermieden, die die Meßergebnisse des Laserscanmikroskops und des Referenzstrahlengangs 9 nachteilig beeinflussen würden.

Der durch den Sekundärreflex 19 zusätzlich ausgekoppelte Lichtstrahl 20 wird mit einem lichtempfindlichen Sensor 21 nachgewiesen, dessen Signalausgang über eine Leitung 22 direkt mit der Digitalisierungseinrichtung 23 verbunden ist. Die mit der Detektionseinrichtung 6 gemessenen Lichtintensitäten der Strahlengänge 7, 9 werden von der Digitalisierungseinrichtung 23 digitalisiert und einem Computer zugeführt. Somit ist es möglich, während der gesamten Messung der beiden Strahlengänge 7, 9 ein permanent vorliegendes Referenzsignal zur Verfügung zu haben, mit dem in erster Linie die Kurzzeitschwankungen der Laser 1, 2 korrigiert werden können. Erfindungsgemäß wird das Referenzsignal des lichtempfindlichen Sensors 21 als Referenzspannung für die Digitalisierungseinrichtung 23 verwendet.

In erfindungsgemäßer Weise werden die gemessenen Bilddaten mit Hilfe der vom Referenzstrahlengang 9 gemessenen Referenzsignale geeignet korrigiert. Hierzu ist vorgesehen, dass in vorteilhafter Weise die Korrektur der gemessenen Bilddaten mit einer Eingangs-Lookup-Tabelle bei der Digitalisierungseinrichtung 23 realisiert wird. Somit wird eine aufgrund von Langzeitschwankungen hervorgerufene Drift einer Baugruppe mit Hilfe der Referenzmessung bei der Digitalisierung mit einem entsprechenden Digitalisierungsoffset versehen. Daher werden keine weiteren elektronischen Bauteile oder mit dem Computer vorzunehmenden Berechnungsschritte benötigt.

Das Verfahren zur Referenzkorrektur mit dem hier vorliegenden erfindungsgemäßen konfokalen Laserscanmikroskop ist dadurch gekennzeichnet, dass das aus dem Beleuchtungsstrahlengang 4 zur Fehlerkompensation dienende Referenzlicht in den Referenzstrahlengang 9 eingekoppelt und von einer Detektionseinrichtung 6 qualitativ und/oder quantitativ nachgewiesen wird. Hierbei werden vor und/oder nach jedem Meßzyklus Referenzsignale gemessen, mit denen gemessene Objektbilddaten geeignet korrigiert werden. Ein Meßzyklus ist in diesem Ausführungsbeispiel durch eine zweidimensionale Datenaufnahme gegeben, d. h. zu

Beginn und nach der Aufnahme einer jeden Bildebene wird eine Referenzmessung mit dem Referenzstrahlengang 9 durchgeführt.

So wird vor bzw. nach einem Meßzyklus nach entsprechender Positionierung des Filteraufnahmeelements 13 zunächst das Referenzsignal R des aktiven Lasers 1 oder 2 gemessen, der zuvor bei der zweidimensionalen Datenaufnahme des Objekts verwendet wurde. Nach erneuter Positionierung des Filteraufnahmeelements 13 wird der Dunkelstrom  $I_0$  des Systems gemessen. Hierbei wird Licht aus dem Detektionsstrahlengang 7 und dem Referenzstrahlengang 9 ausgeblendet.

In erfindungsgemäßer Weise werden die gemessenen Bilddaten  $I_{XYZ}$  mit Hilfe der beiden gemessenen Referenzwerte R und  $I_0$  gemäß der Vorschrift

$$I_{XYZ, \text{KORR}} = F \cdot (I_{XYZ} - I_0) / (R - I_0)$$

korrigiert. F wurde hierbei so gewählt, dass entsprechend dem Dynamikbereich der gemessenen Bilddaten nach der Digitalisierung mit der Digitalisierungseinrichtung 23 ein Grauwertbereich von 24 Bit, entsprechend den Grauwerten von 0 bis 16777215, vorliegt. Diese Korrektur wird in vorteilhafter Weise mit Hilfe einer Eingangs-Lookup-Tabelle realisiert.

Das Ausführungsbeispiel gemäß Fig. 2 unterscheidet sich von dem Ausführungsbeispiel der Fig. 1 dadurch, dass zur Selektion der beiden Laser 1 und 2 ein zusätzliches, drehbar angeordnetes Filteraufnahmeelement 24 vorgesehen ist. Mit diesem Filteraufnahmeelement 24 ist es möglich, entweder Licht vom Laser 1 oder Laser 2 oder keinem der beiden Laser 1, 2 zu selektieren.

Abschließend sei ganz besonders darauf hingewiesen, dass die voranstehend erörterten Ausführungsbeispiele lediglich zur Beschreibung der beanspruchten Lehre dienen, diese jedoch nicht auf die rein willkürlich gewählten Ausführungsbeispiele einschränkt.

#### Patentansprüche

1. Laserscanmikroskop, vorzugsweise konfokales Laserscanmikroskop, mit einem zwischen einer Laserlichtquelle (1, 2) und einem Objekt (3) verlaufenden Beleuchtungsstrahlengang (4) und einem zwischen dem Objekt (3) und einer Detektionseinrichtung (6) verlaufenden Detektionsstrahlengang (7), **dadurch gekennzeichnet**, dass mindestens ein zur Referenzmessung dienender Referenzstrahlengang (9) vorgesehen ist, dass aus dem Beleuchtungsstrahlengang (4) Referenzlicht in den Referenzstrahlengang (9) einkoppelbar ist und dass das Referenzlicht von einer Detektionseinrichtung (6) qualitativ und/oder quantitativ nachweisbar ist.
2. Laserscanmikroskop nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass das Referenzlicht des Referenzstrahlengangs (9) von der Detektionseinrichtung (6) des Detektionsstrahlengangs (7) qualitativ und/oder quantitativ nachweisbar ist.
3. Laserscanmikroskop nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass der Referenzstrahlengang (9) zwischen der Auskopplungsstelle (10) und der Detektionseinrichtung (6) verläuft.
4. Laserscanmikroskop nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, dass die Auskopplungsstelle (10) im Beleuchtungsstrahlengang (4) vorgesehen ist.
5. Laserscanmikroskop nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, dass die Auskopplungsstelle (10) zwischen der Laserlichtquelle (1, 2) und der Strahlteiler-

einrichtung (8) vorgesehen ist.

6. Laserscanmikroskop nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, dass die Auskopplungsstelle (10) an einem als Strahlteilereinrichtung (8) wirkenden AOBs vorgesehen ist.

7. Laserscanmikroskop nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass in dem Referenzstrahlengang (9) weitere optische Komponenten angeordnet sind.

8. Laserscanmikroskop nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, dass in dem Referenzstrahlengang (9) eine Streuscheibe (11) angeordnet ist.

9. Laserscanmikroskop nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, dass in dem Referenzstrahlengang (9) mindestens ein Strahlumlenkelement (25) angeordnet ist.

10. Laserscanmikroskop nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, dass in dem Referenzstrahlengang (9) mindestens ein lichtempfindlicher Sensor angeordnet ist.

11. Laserscanmikroskop nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, dass in dem Referenzstrahlengang (9) mindestens ein Strahlabschwächer (12) angeordnet ist.

12. Laserscanmikroskop nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, dass in dem Referenzstrahlengang (9) eine Filteraufnahmelement (13) angeordnet ist.

13. Laserscanmikroskop nach Anspruch 12, dadurch gekennzeichnet, dass das Filteraufnahmeelement (13) auf den Referenzstrahlengang (9) und/oder Detektionsstrahlengang (7) wirkt.

14. Laserscanmikroskop nach Anspruch 12, dadurch gekennzeichnet, dass das Filteraufnahmeelement (13) mindestens einen Filtereinsatz (16) aufweist und beweglich angeordnet ist.

15. Laserscanmikroskop nach einem der Ansprüche 12 bis 14, dadurch gekennzeichnet, dass mit dem Filteraufnahmeelement (13) entweder kein Licht oder Licht vom Detektionsstrahlengang (7) oder Licht vom Referenzstrahlengang (9) hin zur Detektionseinrichtung (6) selektiert werden kann.

16. Laserscanmikroskop nach Anspruch 12, dadurch gekennzeichnet, dass zur Vermeidung von Störungen aufgrund der Temperaturabhängigkeit der in dem Filteraufnahmeelement (13) verwendeten Filter (16) das Filteraufnahmeelement (13) auf einer konstanten Temperatur gehalten wird.

17. Laserscanmikroskop nach Anspruch 16, dadurch gekennzeichnet, dass das Filteraufnahmeelement (13) durch eine geeignet geregelte Heizung (17), insbesondere durch einen Heizwiderstand, auf einer konstanten Temperatur gehalten wird.

18. Laserscanmikroskop nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, dass die weiteren optischen Elemente des Referenzstrahlengangs (9) von der Auskopplungsstelle (10) aus gesehen nach der Streuscheibe (11) angeordnet sind.

19. Laserscanmikroskop nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, dass als Auskopplungselement (10) ein dicker Strahlteiler verwendet wird.

20. Laserscanmikroskop nach Anspruch 19, dadurch gekennzeichnet, dass der als Auskopplungselement (10) dienende Strahlteiler mindestens 4 mm dick ist.

21. Laserscanmikroskop nach Anspruch 19, dadurch gekennzeichnet, dass am Auskopplungselement (10) neben dem Referenzstrahl (9) mindestens ein weiterer Lichtstrahl (20) ausgekoppelt wird.

22. Laserscanmikroskop nach Anspruch 21, dadurch gekennzeichnet, dass die Intensität des zusätzlich ausgekoppelten Lichtstrahls (20) mit einem lichtempfind-

lichen Sensor (21) nachgewiesen wird.

23. Laserscanmikroskop nach Anspruch 22, dadurch gekennzeichnet, dass das Signal des lichtempfindlichen Sensors (21) als Referenzsignal für die Detektionseinrichtung (6) bzw. die Digitalisierungseinrichtung (23) verwendet wird.

24. Laserscanmikroskop nach Anspruch 23, dadurch gekennzeichnet, dass das Referenzsignal als Referenzspannung für die Digitalisierungseinrichtung (23) verwendet wird.

25. Laserscanmikroskop nach einem der Ansprüche 1 bis 24, dadurch gekennzeichnet, dass die gemessenen Bilddaten mit Hilfe von den mit dem Referenzstrahlengang (9) gemessenen Referenzsignalen geeignet korrigiert werden.

26. Laserscanmikroskop nach Anspruch 25, dadurch gekennzeichnet, dass die Korrektur der gemessenen Bilddaten bei der Digitalisierungseinrichtung (23) mit Hilfe einer Eingangs-Lookup-Tabelle realisiert wird.

27. Laserscanmikroskop nach einem der Ansprüche 1 bis 26, dadurch gekennzeichnet, dass für den Referenzstrahlengang (9) mindestens eine weitere Lichtquelle vorgesehen ist.

28. Laserscanmikroskop nach einem der Ansprüche 1 bis 27, dadurch gekennzeichnet, dass für die Detektion des Lichts im Referenzstrahlengang (9) mindestens ein weiterer Detektor vorgesehen ist.

29. Laserscanmikroskop nach einem der Ansprüche 1 bis 28, dadurch gekennzeichnet, dass die optischen Komponenten (8, 26, 27) des Beleuchtungs- und/oder Detektionsstrahlengangs, die von der Lichtquelle aus gesehen nach der Auskopplungsstelle des Referenzstrahlengangs angeordnet sind, zur Kompensation der Temperaturabhängigkeit auf einer konstanten Temperatur gehalten werden.

30. Verfahren zur Referenzkorrektur bei einem Laserscanmikroskop, vorzugsweise einem konfokalen Laserscanmikroskop mit einem zwischen einer Laserlichtquelle (1, 2) und einem Objekt (3) verlaufenden Beleuchtungsstrahlengang (4) und einem zwischen dem Objekt (3) und einer Detektionseinrichtung (6) verlaufenden Detektionsstrahlengang (7), dadurch gekennzeichnet, dass das aus dem Beleuchtungsstrahlengang (4) zur Fehlerkompensation dienende Referenzlicht in den Referenzstrahlengang (9) eingekoppelt und von einer Detektionseinrichtung (6) qualitativ und/oder quantitativ nachgewiesen wird.

31. Verfahren zur Referenzkorrektur nach Anspruch 30, dadurch gekennzeichnet, dass vor und/oder nach jedem Meßzyklus Referenzsignale gemessen werden, mit denen die gemessenen Objektbilddaten korrigiert werden.

32. Verfahren zur Referenzkorrektur nach Anspruch 31, dadurch gekennzeichnet, dass ein Meßzyklus eine eindimensionale Datenaufnahme umfaßt.

33. Verfahren zur Referenzkorrektur nach Anspruch 31, dadurch gekennzeichnet, dass ein Meßzyklus eine zweidimensionale Datenaufnahme umfaßt.

34. Verfahren zur Referenzkorrektur nach Anspruch 31, dadurch gekennzeichnet, dass ein Meßzyklus eine dreidimensionale Datenaufnahme umfaßt.

35. Verfahren zur Referenzkorrektur nach einem der Ansprüche 30 bis 34, dadurch gekennzeichnet, dass als ein Referenzsignal der Dunkelstrom  $I_0$  des Systems bei ausgeblendeter Lichtquelle gemessen wird.

36. Verfahren zur Referenzkorrektur nach einem der Ansprüche 30 bis 34, dadurch gekennzeichnet, dass als ein Referenzsignal die Referenz R gemessen wird.

37. Verfahren zur Referenzkorrektur nach einem der Ansprüche 30 bis 34, dadurch gekennzeichnet, dass als ein Referenzsignal der Dunkelstrom  $R_0$  der Referenz gemessen wird.

38. Verfahren zur Referenzkorrektur nach Anspruch 30 bis 37, dadurch gekennzeichnet, dass die korrigierten Bilddaten  $I_{XYZ,KORR}$  mit Hilfe der gemessenen Bilddaten  $I_{XYZ}$  gemäß der Vorschrift

$$I_{XYZ,KORR} = F \cdot (I_{XYZ} - I_0) / (R - R_0) \quad 10$$

korrigiert werden, wobei F ein geeigneter Skalierungsfaktor ist.

39. Verfahren zur Referenzkorrektur nach Anspruch 38, dadurch gekennzeichnet, dass  $I_0 = R_0$  gesetzt wird. 15

---

Hierzu 3 Seite(n) Zeichnungen

---

20

25

30

35

40

45

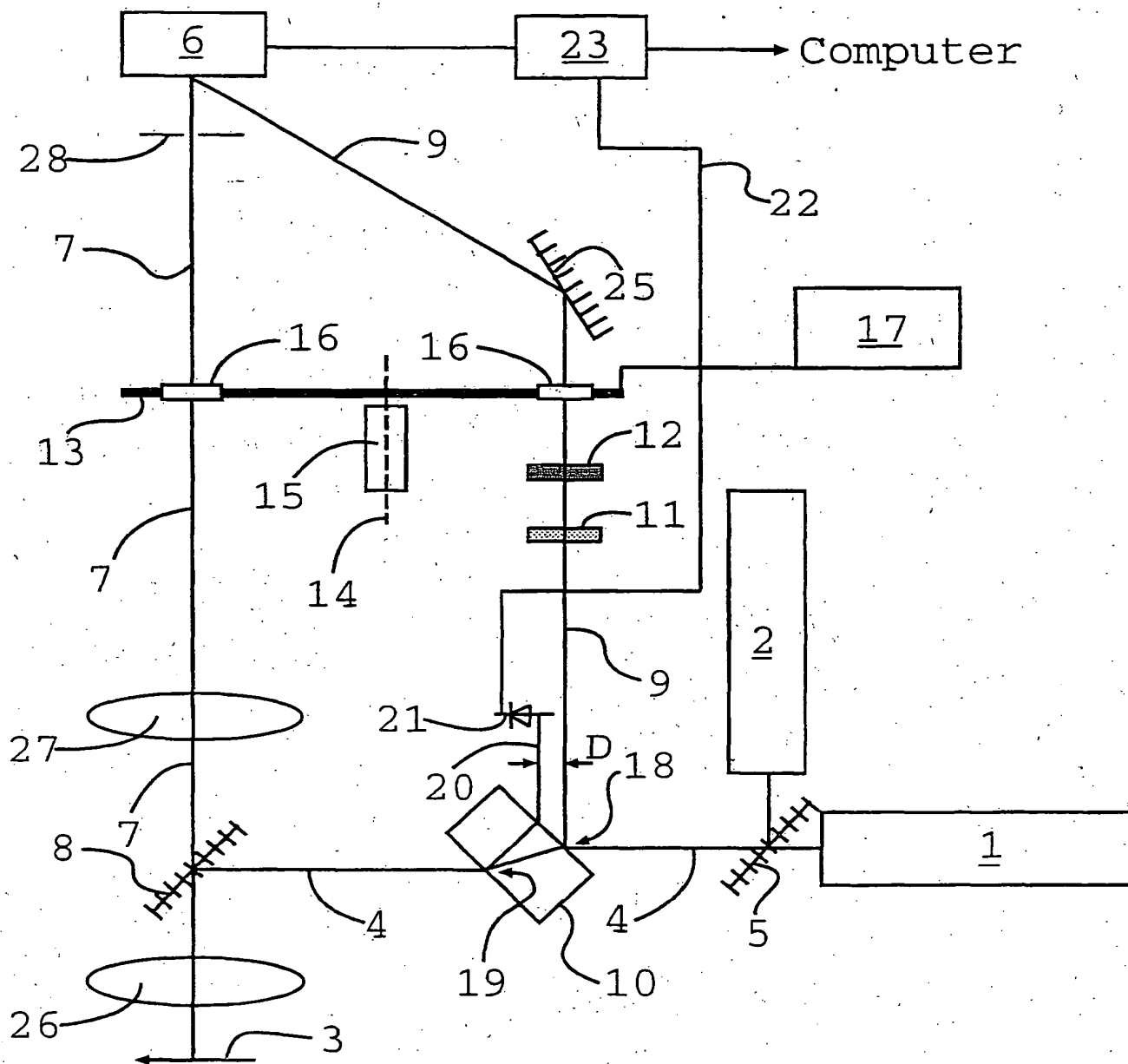
50

55

60

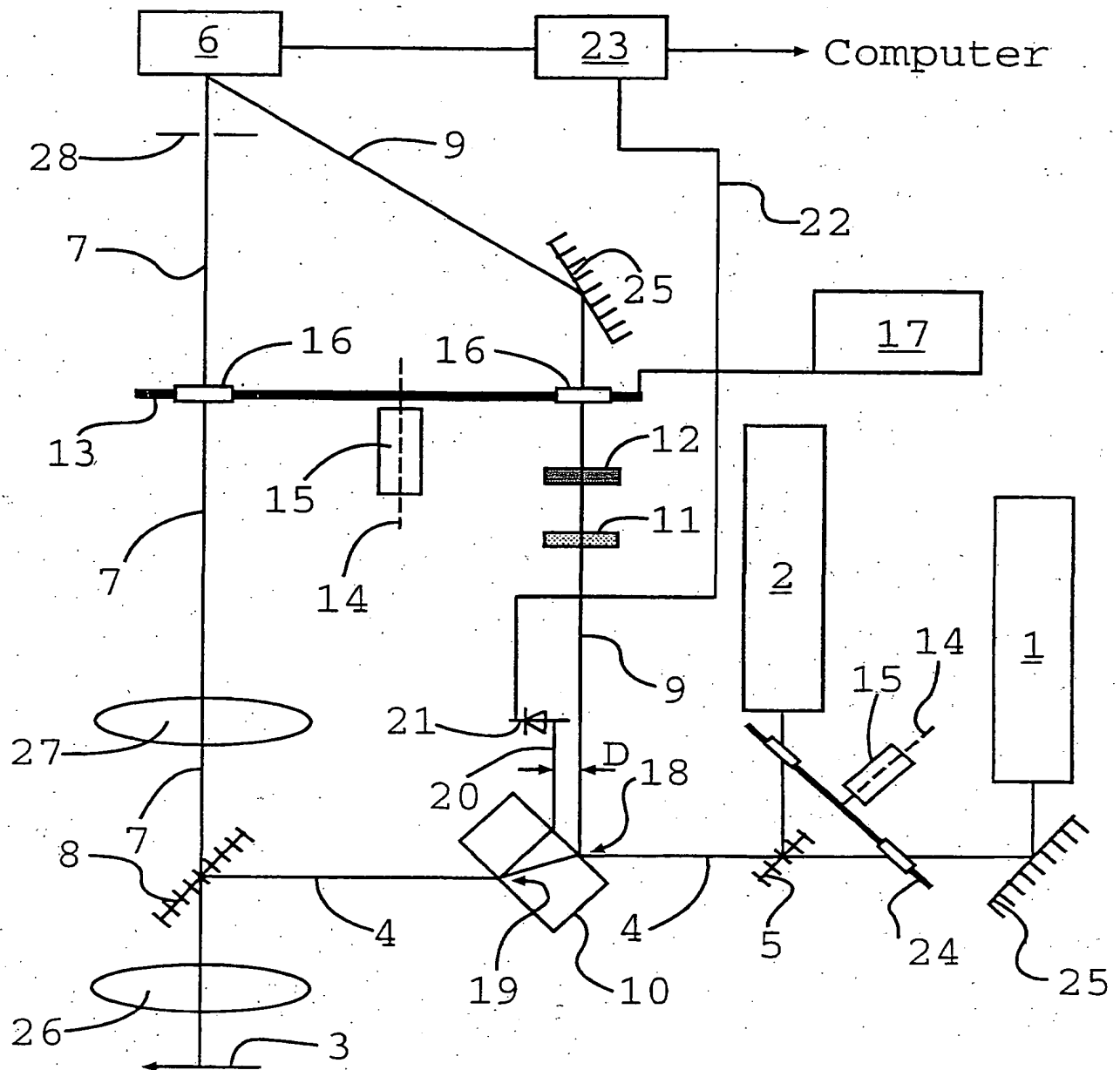
65

**Fig. 1**





**Fig. 2**



**Fig. 3**

